

# 阿维菌素对小菜蛾的抗性选育及其对 解毒酶活性的影响

李腾武, 高希武\*, 郑炳宗, 许向丽

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

**摘要:** 用阿维菌素对小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 进行了抗性选育, 并对选育过程中小菜蛾解毒酶的活性进行了研究。选育从  $F_0$  至  $F_{21}$  代, 抗性缓慢波动上升, 达到选育前的 122.91 倍;  $F_{21}$  至  $F_{27}$  代, 抗性迅速增长, 达到选育前的 812.73 倍, 抗性发展趋势呈现 S 型曲线。随着选育代数的增加, 对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 没有明显的影响; 羧酸酯酶 (CarE) 活性,  $F_{27}$  是  $F_0$  的 1.5 倍, 从  $F_{22}$  开始, 活性在较高水平上波动; 谷胱甘肽转移酶 (GST) 活性  $F_{27}$  是  $F_0$  的 2.2 倍, 且从  $F_{18}$  开始, 活性在较高水平上波动。选育的抗性品系, 增效醚对阿维菌素增效 6.34 倍。

**关键词:** 小菜蛾; 阿维菌素; 抗性选育; 解毒酶; 乙酰胆碱酯酶

**中图分类号:** Q965.9

**文献标识码:** A

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 之所以成为世界上十字花科蔬菜主要害虫, 主要因为其抗药性水平不断提高, 这也是在自然选择下不断进化的结果。目前在许多国家或地区小菜蛾已对有机氯、有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯、酰基脲类和生物制剂 (Bt) 等产生了不同程度的抗性, 抗性水平最高可达数万倍<sup>[1,2]</sup>。阿维菌素 (AVMs) 对鳞翅目、同翅目、鞘翅目和双翅目害虫及多种害螨, 特别是对常规农药具抗药性的害螨和害虫, 如小菜蛾、斑潜蝇、红蜘蛛、菜青虫等均具有良好的防效。

针对小菜蛾抗性水平高、发展速度快、交互抗性谱广, 我国开发应用了 AVMs 制剂和以 AVMs 为主的混配制剂来防治小菜蛾, 由南方到北方效果良好。目前关于家蝇 *Musca domestica* L.、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Say)、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch、小菜蛾等对 AVMs 抗性的生理生化、遗传学等均有研究报道<sup>[3~7]</sup>。帅应垣等 1994 年就报道了个别地区小菜蛾对刚刚引进的 AVMs 抗性已达到 7 倍<sup>[8]</sup>。Wright 等报道马来西亚 Cameron 地区的 4 个小菜蛾田间种群对 AVMs 已产生 17~195 倍抗性, 这可能是小菜蛾田间种群对 AVMs 产生明显抗性的首次报道<sup>[9]</sup>。但就小菜蛾对 AVMs 抗性发展的速度还难以预测, 我们在室内对采自河北宣化的田间种群用 AVMs 进行了抗性选育, 并对其抗性机制进行了初步的研究。

基金项目: 国家“九五”攻关项目

\* 通讯作者

收稿日期: 1999-08-19; 修订日期: 2000-02-18

# 1 材料和方法

## 1.1 供试昆虫及饲养

宣化种群采自河北省宣化田间,阿维菌素抗性品系(AV-R)由宣化种群室内汰选所得,阿维菌素敏感品系(XH-S)由同源的宣化种群在不接触药剂情况下同步饲养所得,室内饲养采用蛭石萝卜苗法<sup>[10,11]</sup>。

## 1.2 化学试剂及药剂

$\alpha$ -乙酸萘酯( $\alpha$ -NA),上海试剂一厂产品,化学纯; $\beta$ -乙酸萘酯( $\beta$ -NA),北京化工厂产品,化学纯;碘化硫代乙酰胆碱(ATCh),Fluka公司产品;5,5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB),为Roth公司产品;还原型谷胱甘肽(GSH),1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB),为Sigma公司产品;91.2%阿维菌素原药由中国农业大学新技术开发总公司提供;90%增效醚(Pb)为美国Aldrich公司产品;Triton X-100为上海化学试剂采购供应站美国进口分装。

## 1.3 抗性选育方法

当小菜蛾幼虫群体多数进入3龄时(2 mg/头~3 mg/头),根据上一代对AVMs的毒力测定结果,配制杀死种群为70%~80%的剂量,采用喷雾法将药液均匀喷洒于带有供选试虫的萝卜苗上,需更换的新鲜萝卜苗也喷以相同浓度的药液,继续饲养直到化蛹。逐代进行汰选,隔1~2代进行一次毒力测定。

## 1.4 生物测定方法

参照Ismail和Wright<sup>[12,13]</sup>叶片药膜法,取新鲜无农药污染的甘蓝叶片浸在系列浓度的药液中10 s,以蒸馏水(含0.01%乳化剂)作对照,室内晾干后接上大小一致的幼虫(2 mg/头~3 mg/头),每个浓度3~4次重复,每个重复10~20头幼虫,统计48 h结果。增效剂试验以AVMs的最高浓度与增效醚的比例1:3。用POLO软件计算LC<sub>50</sub>值和毒力回归方程的斜率(b)。

## 1.5 羧酸酯酶活性测定

参照高希武等和李腾武等方法<sup>[14,15]</sup>,将4龄幼虫饥饿12~24 h后称重,4 mg/头~5 mg/头,加pH7.0,0.04 mol/L的磷酸缓冲液匀浆,制备的酶液冰浴待测。以 $\alpha$ -NA或 $\beta$ -NA为底物(含毒扁豆碱 $10^{-5}$  mol/L),在30℃水浴反应15 min,然后加入1 mL显色液终止反应,分别在555 nm和600 nm处测定光密度值,重复3次。

## 1.6 谷胱甘肽转移酶(GST)活性测定

取饥饿12~24 h的4龄幼虫胸腹部,加pH6.5,0.1 mol/L磷酸缓冲液匀浆,制备的酶液冰浴待测。参考Habig等方法<sup>[16]</sup>,取2.7 mL pH6.5,0.1 mol/L的磷酸钾缓冲液,0.1 mL GSH,0.1 mL酶液加入到比色杯中,用UV-120-02型分光光度计在340 nm下调零,而后加入0.1 mL CDNB使反应开始,U-135C型数据记录仪采集数据,重复3次。

## 1.7 乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定

取饥饿12~24 h 4龄幼虫头部,加pH7.5,0.1 mol/L磷酸缓冲液匀浆,制备的酶液冰浴待测。采用Gorun等改进的Ellman等的方法<sup>[17,18]</sup>。取待测酶液0.1 mL与0.1 mL底物(ATCh,10 mmol/L)混匀,在30℃水浴反应15 min,然后加入3.6 mL DTNB( $10^{-5}$  mol/L)

乙醇（40%）溶液终止反应并显色，在 412 nm 处测定光密度值，重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾对阿维菌素的抗性选育

选择对 AVMs 抗性水平较低的宣化田间种群，分成两组，一组以 AVMs 进行抗性选育，另一组不接触药剂同步饲养。选育前（F<sub>0</sub> 代）3 龄幼虫的 LC<sub>50</sub> 值为 0.011 mg/L。开始选育用 AVMs 处理的浓度为 0.016 mg/L，以后处理浓度逐步提高。饲养 27 代，每代都进行施药。

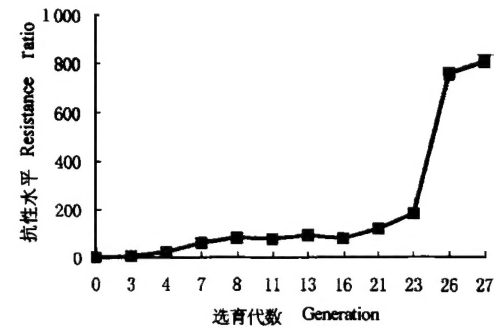


图 1 小菜蛾对阿维菌素抗性选育代数与抗性水平的关系  
Fig. 1 Selection of diamondback moth resistance by avermectins

从图 1 可以看出，随着抗性选育代数的增加，LC<sub>50</sub> 值逐渐增大，抗性水平不断提高。在药剂选育初期（F<sub>0</sub> ~ F<sub>3</sub> 代），抗性发展变化不大，抗性倍数在 10 以下；从 F<sub>3</sub> ~ F<sub>21</sub> 代，抗性逐渐上升，LC<sub>50</sub> 值由 0.071 上升为 1.352，抗性达 123 倍；从 F<sub>21</sub> ~ F<sub>26</sub> 代，抗性增长迅速，其抗药性的形成发展呈 S 型。经过 27 代选育，该小菜蛾种群对 AVMs 的敏感度显著下降，即 LC<sub>50</sub> 值由选育前的 0.011 mg/L 上升至选育后的 8.940 mg/L，抗性达 812.73 倍。在选育过程中，抗性并不是直线上升，达到一定程度后，抗性水平在小范围内出现波动。

2.2 阿维菌素选育种群不同世代 CarE、GST、AChE 的活性变化

由表 1、表 2、表 3 可以看出，AVMs 对小菜蛾选育 27 代后同选育前相比，CarE 活性 F<sub>27</sub>

表 1 AVMs 对小菜蛾抗性汰选后不同世代 CarE 的比活力变化

Table 1 Changes of carboxylesterase activity after selection by avermectins in diamondback moth

世代 Generation	α-NA OD <sub>600</sub> /(mg·min)	变化倍数 Relative ratio	β-NA OD <sub>555</sub> /(mg·min)	变化倍数 Relative ratio
F <sub>0</sub>	0.978 ± 0.034	1	1.051 ± 0.016	1
F <sub>4</sub>	0.863 ± 0.025	0.9	1.134 ± 0.008	1.1
F <sub>6</sub>	1.106 ± 0.014	1.1	1.401 ± 0.007	1.3
F <sub>7</sub>	0.424 ± 0.005	0.4	0.464 ± 0.004	0.4
F <sub>10</sub>	0.512 ± 0.011	0.5	0.545 ± 0.006	0.5
F <sub>11</sub>	0.307 ± 0.003	0.3	0.345 ± 0.001	0.3
F <sub>13</sub>	0.258 ± 0.004	0.3	0.321 ± 0.004	0.3
F <sub>16</sub>	0.542 ± 0.008	0.6	0.617 ± 0.006	0.6
F <sub>18</sub>	0.733 ± 0.036	0.7	0.814 ± 0.021	0.8
F <sub>19</sub>	0.725 ± 0.009	0.7	0.632 ± 0.015	0.6
F <sub>20</sub>	0.791 ± 0.020	0.8	0.824 ± 0.008	0.8
F <sub>22</sub>	1.344 ± 0.025	1.4	1.552 ± 0.046	1.5
F <sub>23</sub>	0.830 ± 0.014	0.8	1.009 ± 0.029	1.0
F <sub>24</sub>	1.190 ± 0.082	1.2	1.296 ± 0.003	1.2
F <sub>25</sub>	0.980 ± 0.027	1.0	1.225 ± 0.010	1.2
F <sub>26</sub>	1.031 ± 0.032	1.1	1.189 ± 0.023	1.1
F <sub>27</sub>	1.395 ± 0.054	1.4	1.524 ± 0.024	1.5

代是  $F_0$  代的 1.4 ( $\alpha$ -NA) 和 1.5 ( $\beta$ -NA) 倍, 差异显著 ( $P<0.05$ ), 且从  $F_{22}$  代开始, CarE 活性在较高水平上波动。GST 活性变化  $F_{27}$  代是  $F_0$  代的 2.2 倍, 差异极显著 ( $P<0.01$ ), 且从  $F_{18}$  代开始, GST 活性在较高水平上波动。说明小菜蛾对 AVMs 抗性水平的提高可能部分与 CarE 和 GST 活性增强有关。经过 27 代的选育, AChE 活性总体变化不大, AVMs 的选育对小菜蛾 AChE 没有明显的影响。

表 2 AVMs 对小菜蛾抗性汰选后不同世代 GST 的比活力变化

Table 2 Changes of GST activity after selection by avermectins in diamondback moth		
世代 Generation	GST 活性 OD <sub>340</sub> /(mg·min)	变化倍数 Relative ratio
$F_0$	1.663±0.063	1
$F_4$	1.320±0.037	0.8
$F_6$	2.808±0.121	1.7
$F_7$	1.643±0.029	1.0
$F_{10}$	1.071±0.036	0.6
$F_{11}$	1.908±0.030	1.1
$F_{13}$	1.274±0.043	0.8
$F_{16}$	1.695±0.041	1.0
$F_{18}$	3.858±0.117	2.3
$F_{19}$	3.241±0.039	1.9
$F_{20}$	3.301±0.103	2.0
$F_{22}$	3.518±0.145	2.1
$F_{23}$	2.880±0.135	1.7
$F_{24}$	2.357±0.044	1.4
$F_{25}$	2.583±0.110	1.6
$F_{26}$	2.767±0.063	1.7
$F_{27}$	3.579±0.114	2.2

表 3 AVMs 对小菜蛾抗性汰选后不同世代 AChE 的比活力变化

Table 3 Changes of acetylcholinesterase activity after selection by avermectins in diamondback moth		
世代 Generation	AChE 活性 OD <sub>412</sub> /(mg·min)	变化倍数 Relative ratio
$F_0$	0.164±0.003	1
$F_4$	0.148±0.005	0.9
$F_6$	0.200±0.001	1.2
$F_7$	0.211±0.008	1.3
$F_{10}$	0.189±0.005	1.2
$F_{11}$	0.162±0.003	1.0
$F_{13}$	0.172±0.008	1.0
$F_{16}$	0.223±0.004	1.4
$F_{18}$	0.119±0.007	0.7
$F_{19}$	0.162±0.010	1.0
$F_{20}$	0.179±0.008	1.1
$F_{22}$	0.215±0.014	1.3
$F_{23}$	0.156±0.002	1.0
$F_{24}$	0.170±0.004	1.0
$F_{25}$	0.141±0.010	0.9
$F_{26}$	0.167±0.003	1.0
$F_{27}$	0.228±0.003	1.4

2.3 增效剂对 AVMs 抗性品系的增效作用

对 AVMs 抗性品系以 AVMs 加增效剂 (Pb) 和不加 Pb 两种处理, 进行生物测定, AVMs 对抗性品系的毒力  $LC_{50}$  值为 8.940 (4.741~18.218), 加增效剂 (Pb) 后,  $LC_{50}$  值降为 1.410 (0.212~6.785), 增效 6.34 倍, 抗性倍数从 813 倍下降到 128 倍。说明 MFO 活性提高是小菜蛾对 AVMs 抗性的机制之一。

3 讨论

用 AVMs 选育 27 代后, 小菜蛾对 AVMs 的抗性是同源不接触药剂种群的 812.73 倍。开始选育至 21 代, 抗性缓慢上升, 达到选育前的 122.91 倍, 比用菊酯类选育抗性增长缓慢, Yu 和 Nguyen 用氯菊酯选育小菜蛾至 21 代, 抗性超过 600 倍<sup>[19]</sup>。而比用有机氮类杀虫剂选育抗性增长快, 用杀虫双和杀螟丹在实验室以点滴法处理小菜蛾 4 龄幼虫, 连续继代选育至

35 代, 对杀虫双和杀螟丹的抗性比选育前提高了 51 倍和 25 倍<sup>[20]</sup>。以 AVMs 对小菜蛾继续选育至 27 代, 抗性迅速增长, 达到选育前的 812.73 倍, 抗性发展呈现 S 型曲线。

小菜蛾选育不同代数 AChE、CarE、GST 活性测定表明, 随着选育代数的增加, AChE 活性变化不大, AVMs 的选育对小菜蛾 AChE 没有明显的影响。GST 活性变化较大, 选育 27 代是选育前的 2.2 倍, 而且从选育 18 代开始, GST 活性在较高水平上波动。选育的 27 代 CarE 活性是选育前的 1.4~1.5 倍, 而且从 22 代开始, CarE 活性在较高水平上波动, 说明小菜蛾对 AVMs 抗性水平的提高可能与 GST 和 CarE 活性增强有关。

用增效醚 (Pb) 对 AVMs 抗性品系处理, 进行生物测定, 加 Pb 比不加 Pb AVMs 对小菜蛾抗性品系毒力增加 6.34 倍。说明 MFO 活性提高可能是小菜蛾对 AVMs 抗性的重要机制之一。Sun 对台湾小菜蛾的研究表明, 小菜蛾对 AVMs 的抗性与 MFO 有关<sup>[21]</sup>。Iqbal 和 Wright 对 AVMs 选育的室内 220 倍的小菜蛾抗性种群, 用 Pb、DEF 和马来酸二乙酯处理, 结果使 AVMs 毒效分别增加 4 倍、3 倍和 2 倍, 因而推测小菜蛾对 AVMs 的抗性可能与 MFO、酯酶和 GST 有关<sup>[22]</sup>。本研究结果表明, 小菜蛾对 AVMs 的抗性机制可能涉及 MFO、GST、CarE 等多个酶系统, 还可能与 AVMs 的靶标 GABA 受体的变构有关。从以上多种抗性机制分析, 小菜蛾对 AVMs 的抗性遗传可能为多基因控制。小菜蛾对 AVMs 的主导抗性机制及抗性遗传规律还有待于进一步研究。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Hama H. Development of pyrethroid resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 1987, 22: 166~175
- [2] 周成理, 唐振华, 张丽妹. 小菜蛾幼虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗药性与多功能氧化酶的关系. *植物保护学报*, 1993, 20 (1): 91~95
- [3] Argentine J A, Clark J M, Lin H. Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of colorado potato beetle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1992, 44: 191~207
- [4] Argentine J A, Clark J M. Selection for abamectin resistance in colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pestic. Sci.*, 1990, 28: 17~24
- [5] Clark J M, Argentine J A, Lin H *et al.* Mechanisms of abamectin resistance in the colorado potato beetle. In: Mullins C A, Scott J G eds. *Molecular Mechanisms of Insecticide Diversity among Insects*. Washington, DC. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 322. 1992, 247~263
- [6] Konno Y, Scott J G. Biochemistry and genetics of abamectin resistance in the housefly. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1991, 41: 21~28
- [7] Clark J M, Scott J G, Campos F *et al.* Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. *Annu. Rev. Entomol.*, 1994, 40: 1~30
- [8] 帅应垣, 冯 夏, 陈焕瑜. 广东供港菜区小菜蛾抗药性研究初报. *广东农业科学*, 1994, 4: 31~32, 18
- [9] Wright D J, Iqbal M, Verkerk R H J. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and abamectin in the diamondback moth, *Plutella xylostella*: a major problem for integrated pest management? *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent.*, 1995, 60 3b: 927~933
- [10] 陈之浩, 刘传秀, 李凤良等. 小菜蛾继代繁殖大量饲养方法研究初报. *贵州农业科学*, 1990, (4): 52~53
- [11] 刘传秀, 韩招久, 李凤良等. 应用蛭石萝卜苗法室内继代大量繁殖小菜蛾的研究. *昆虫知识*, 1993, 30 (6): 341~344
- [12] Ismail F, Wright D J. Cross-resistance between acylurea insect growth regulators in a strain of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) from Malaysia. *Pestic. Sci.*, 1991, 33: 359~370

- [13] Ismail F, Wright D J. Synergism of teflubenzuron and chlorfluazuron in an acylurea-resistant field strain of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Pestic. Sci.*, 1992, 34: 221~226
- [14] 高希武, 郑炳宗, 陈仲兵. 小菜蛾羧酸酯酶性质的研究. 南京农业大学学报, 1996, 19 (Suppl.): 122~126
- [15] 李腾武, 高希武, 郑炳宗等. 不同地区小菜蛾种群羧酸酯酶的毒理学性质研究. 昆虫学报, 1998, 41 (Suppl.): 26~33
- [16] Habig W H. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. In: William B J ed. *Method in Enzymology*. Academic Press, 1981, 77: 398~405
- [17] Gorun V, Proinov L, Baltescu V *et al.* Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. *Anal. Biochem.*, 1978, 86: 324~326
- [18] 高希武. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识, 1987, 24: 245~246
- [19] Yu S J, Nguyen S N. Insecticide susceptibility and detoxication enzyme activities in permethrin-selected diamondback moths. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1996, 56: 69~77
- [20] 陈之浩, 刘传秀, 李凤良等. 杀虫双和杀螟丹选育对小菜蛾抗药性的形成及其抗性机制. 昆虫学报, 1993, 36: 409~418
- [21] Sun C N. Insecticide resistance in diamondback moth. In: Talker N S ed. *Diamondback Moth and other Crucifer Pests Proceedings of the Second International Workshop*, Tainan, Taiwan, Taipei. 1992, 419~426
- [22] Iqbal M, Wright D J. Evaluation of resistance, cross-resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistance field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.*, 1997, 87: 481~486

## Study on resistance selection by avermectins and its effect on activities of detoxification enzymes in *Plutella xylostella* (L.)

LI Teng-wu, GAO Xi-wu\*, ZHENG Bing-zong, XU Xiang-li

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract:** The resistance selection of diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.), to avermectins (AVMs) and its effect on activities of detoxification enzymes in AVMs-selected DBM were investigated during 1996~1999. After 27 generations of continuous selection pressure, resistance to AVMs was over 812-folds in this strain compared with the unselected parents. Resistance selection by AVMs has no effect on activity of acetylcholinesterase (AChE). The activities of carboxylesterase (CarE) and glutathione S-transferases (GST) in DBM larvae of F<sub>27</sub> generation increased 1.5 and 2.2-folds respectively, compared with the unselected parents (F<sub>0</sub>). Piperonyl butoxide (Pb) can moderately increase the toxicity of AVMs to the selected strain for about 6-folds. It suggests that the resistant mechanisms of DBM to AVMs were probably associated with microsomal mixed function oxidases (MFO), GST and CarE.

**Key words:** *Plutella xylostella*; avermectins; resistance selection; detoxification; acetylcholinesterase